

Aus der Hämatologischen Abteilung im Klinikum Steglitz
der Freien Universität Berlin
Leiter: Prof. Dr. med. H. Brücher

**Die Wirkung der L - Asparaginase aus E. coli auf die
Makrophagen-Wanderungs-Hemmung und die
Lymphozyten-Transformation durch Tuberkulin**

Inaugural - Dissertation

zur

Erlangung der medizinischen Doktorwürde
an den Medizinischen Fachbereichen
der Freien Universität Berlin

vorgelegt von

Wolfgang Schlag
Berlin

1973

Aus der Hämatologischen Abteilung im Klinikum Steglitz
der Freien Universität Berlin

Leiter: Prof. Dr. med. H. Brücher

**Die Wirkung der L - Asparaginase aus E. coli auf die
Makrophagen-Wanderungs-Hemmung und die
Lymphozyten-Transformation durch Tuberkulin**

Inaugural - Dissertation

zur

Erlangung der medizinischen Doktorwürde
an den Medizinischen Fachbereichen
der Freien Universität Berlin

vorgelegt von

Wolfgang Schlag

Berlin

Referent: Prof. Dr. med. H. Brücher

Korreferent: Prof. Dr. med. I. Hoppe



**Gedruckt mit Genehmigung der Medizinischen Fachbereiche
der Freien Universität Berlin**

Promoviert am: 1. 10. 1973

Druck: Zentrale Universitätsdruckerei V a A 7
1 Berlin 41, Kelchstraße 31

Aus der Hämatologischen Abteilung (Prof. Dr. H. Brücher)
im Klinikum Steglitz der Freien Universität Berlin

Vergleichende Untersuchung verschiedener Methoden zur Isolierung peripherer menschlicher Lymphozyten

Von H. Scholle, W. Schlag und H. Rühl

Einleitung

Die Gewinnung möglichst reiner funktionstüchtiger Lymphozytenpopulationen aus dem Blut des Menschen ist für Untersuchungen über die Funktionen dieser Zellen und für die Herstellung spezifischer Antisera von großer Bedeutung. Bei der beschleunigten Sedimentation der Erythrozyten mit Hilfe von Makromolekülen wie Dextran kann man einen leukozytenreichen Überstand gewinnen, dessen Zellzusammensetzung im wesentlichen der des Vollblutes entspricht.

In den letzten Jahren wurden verschiedene Methoden beschrieben, die eine Abtrennung der Lymphozyten von den anderen weißen Blutzellen ermöglichen. Dazu wird entweder die unterschiedliche Adhärenz der Zellen bestimmten Oberflächen gegenüber [1,4,7,8,11,18,19], die unterschiedliche Dichte der Zellen [2,3,10,12,14,17,22,24] oder die Phagozytosefähigkeit der Granulozyten und Monozyten ausgenutzt [5,6,9]. Als besonders geeignet zur Gewinnung weitgehend reiner Lymphozytensuspensionen wurde kürzlich eine Trennung mit Hilfe des Jodamids „Uromiro“ beschrieben [16]. In der vorliegenden Arbeit soll diese Trennmethode mit anderen gebräuchlichen Methoden verglichen werden.

Material und Methode

Heparinisiertes Venenblut von 12 gesunden Versuchspersonen wurde jeweils nach den folgenden vier Methoden aufgearbeitet:

1. Gewinnung des leukozytenreichen Überstandes nach Spontansedimentation mit einer 6proz. Dextranlösung (Makrodex®) für 60 min bei 37° C wie beschrieben [13].
2. Modifizierte Säulentrennung nach der von Brandt und Mitarb. angegebenen Methode [4]. Glasröhren (30 × 1 cm³) mit Wärmemantel (37° C) wurden mit sterilisierten Nylonfasern gestopft. Die Durchflußgeschwindigkeit des Vollblutes stellten wir auf etwa 2 ml/min ein. Anschließend wurden die Erythrozyten durch Spontansedimentation mit Dextran weitgehend entfernt.
3. Trennung nach der von Böyum beschriebenen Ficoll-Isopaque-Methode [3]. Das Vollblut wurde dazu mit physiologischer Kochsalzlösung im Verhältnis 1 : 4 verdünnt. In 30-ml-Zentrifugengläsern wurden dann auf 8 ml Ficoll-Isopaque-Lösung (9,556 g Ficoll, 20,0 ml Isopaque und 130,4 ml Aqua dest.) 16 ml verdünntes Blut geschichtet und anschließend 40 min bei 400 × g zentrifugiert. Die Zellen wurden von der Grenzschicht abgehebt und anschließend zweimal gewaschen.
4. Trennung mit Hilfe des Jodamids „Uromiro“ nach der von Otto und Mitarb. angegebenen Methode [16]. Auf 15 ml Uromiro-Lösung (22,35 ml Uromiro 380 und 100 ml Aqua dest.) wurden 15 ml Vollblut überschichtet und 30 min lang bei 525 × g zentrifugiert. Anschließend wurden die Zellen von der Grenzschicht gewonnen und zweimal mit physiologischer Kochsalzlösung gewaschen.

Eingegangen am 25. 10. 1971.

Unmittelbar nach den Trennungen wurden aus den Zellsuspensionen die Zellzahlen mit einem elektronischen Teilchenzähler (Coulter Counter Modell S) bestimmt. Daneben wurde der Anteil vitaler Zellen mit der Trypanblau-Methode nach Turk und Mitarb. [23] ermittelt. Als weiterer Parameter für die Funktionstüchtigkeit der Zellen wurde die DNS-Synthese bei der Lymphozytentransformation durch Phythämagglutinin (PHA P, Difco) in Kurzzeitkulturen nach einer früher beschriebenen Methode [20] gemessen.

Zur Differenzierung der Zellen wurden neben den üblichen Zellaussstrichen Präparate mit der Zytozentrifuge angefertigt und nach Pappenheim gefärbt. Parallel dazu wurden Ausstriche mit der unspezifischen Esterasefärbung nach Leder [15] gefärbt, um neben den üblichen morphologischen Kriterien ein weiteres Merkmal zur Differenzierung der monokleären Zellen heranzuziehen. Es wurden jeweils 1000 Zellen ausgezählt.

Ergebnisse

Wie Tab. 1 zeigt, war die quantitative Zellausbeute bei der Trennung mit „Uromiro“ am größten; im Mittel konnten 76% der Blutlymphozyten isoliert werden. Dagegen betrug die Zellausbeute bei der Säulentrennung mit anschließender Spontansedimentation im Durchschnitt nur 38%, während bei der „Ficoll-Isopaque“-Methode 52% der im Blut enthaltenen Lymphozyten gewonnen werden konnten.

Methode	Differenzierung der Zellsuspensionen			Ausbeute an Lymphozyten*
	Lymphozyten %	Granulozyten %	Monozyten %	
Spontansedimentation	53 ± 9	43 ± 8	4 ± 2	42 ± 6
Säulentrennung	98 ± 2	2 ± 2	1 ± 1	38 ± 4
„Ficoll-Isopaque“	86 ± 6	2 ± 1	12 ± 5	52 ± 4
„Uromiro“	83 ± 5	1 ± 1	16 ± 5	76 ± 5

* bezogen auf die im Vollblut vorgegebene Lymphozytenzahl.

Tab. 1: Vergleich verschiedener Methoden zur Isolierung von Blutlymphozyten in Hinblick auf Zellausbeute und Reinheit der Lymphozytensuspensionen bei 12 gesunden Versuchspersonen.

Darüber hinaus kann deutlich gezeigt werden, daß im Gegensatz zur Spontansedimentation mit Dextran alle anderen Trennmethode zu Zellsuspensionen führen, in denen die Lymphozyten gut angereichert waren. Eine nahezu reine Population ergab die Säulentrennung mit durchschnittlich 98% Lymphozyten. Dagegen wurden durch die beiden Trennmethode, die auf der unterschiedlichen Dichte der Blutzellen beruhen, neben den Lymphozyten auch der zweite mononukleäre Zelltyp, die Monozyten, angereichert (Tab. 1).

Die Prüfungen auf Vitalität ließen zwischen den Methoden keine wesentlichen Unterschiede erkennen; der Prozentsatz gefärbter Zellen bei der Trypanblau-Methode war in keinem Fall höher als 10%. Auch die PHA-Stimulation als weiterer Parameter der Funktionstüchtigkeit der Zellen zeigte bei gleicher Zellzahl pro Kultur keine eindeutigen Unterschiede (Tab. 2).

Die Kontamination mit Erythrozyten war unterschiedlich groß. Zellsuspensionen, die nach Dextransedimentation gewonnen wurden, enthielten erwartungsgemäß sehr viel Erythrozyten, während bei der Trennung mit „Uromiro“ und „Ficoll-Isopaque“ weitgehend erythrozytenfreie Zellsuspensionen gewonnen wurden.

Methode	Trypanblau % gefärbte Zellen	PHA-Stimulation SI*
Spontansedimentation	3 (1,5–5)	210 (98–255)
Säulentrennung	7 (4–9)	168 (72–223)
„Ficoll-Isopaque“	4 (2–6)	163 (101–203)
„Uromiro“	5 (2–6)	186 (96–251)

$$* SI = \frac{\text{mittlere CPM in PHA-behandelten Kulturen}}{\text{mittlere CPM in unbehandelten Kontrollkulturen}}$$

Tab. 2: Trypanblau-Vitalitätsuntersuchung und PHA-Stimulation (0,1 µl/ml PHA P, Difco, ³H-Thymidineinbau nach 72 h Kulturdauer) in den gewonnenen Zellsuspensionen.

Besprechung

Nach unseren Ergebnissen können mit Hilfe der Säulentrennmethode nahezu reine Lymphozytensuspensionen gewonnen werden; sie ist damit allen anderen bisher bekannten Trennmethoden überlegen. Dabei ist aber zu berücksichtigen, daß durch die große Kontamination mit Erythrozyten die Lymphozytentransformationsrate beeinflußt werden könnte, wie dies kürzlich bei der PHA-Stimulation gezeigt wurde [21]. Ob auch der geringe Anteil an Monozyten bei bestimmten immunologischen Fragestellungen stören könnte, die die Interaktion von Lymphozyten und Monozyten betreffen, wäre zu prüfen.

Im Gegensatz zu den Untersuchungen von *Otto* und *Schmid* [16] haben wir bei der Trennung mit „Uromiro“ ebenso wie bei der „Ficoll-Isopaque“-Methode einen großen Anteil Monozyten in den gewonnenen Zellsuspensionen gefunden. Beide Methoden sind nach unserer Meinung im Hinblick auf die Reinheit der Lymphozytenpopulationen der Säulentrennung unterlegen, liefern aber – was die Zellausbeute und die Kontamination mit Erythrozyten anbelangt – bessere Ergebnisse.

Zusammenfassung

Beim Vergleich verschiedener Methoden, die der Isolierung von Lymphozyten aus dem menschlichen Blut dienen, hat sich die Säulentrennung in bezug auf die Reinheit der Lymphozytensuspensionen als die beste Methode erwiesen. Die Trennungen der Blutzellen auf Grund ihrer unterschiedlichen Dichte führte bei besseren Zellausbeuten zu Zellsuspensionen mit großem Monozytenanteil.

Summary

Comparing various methods for separation of human peripheral lymphocytes from other blood cells purification on nylon fibre columns has proved to be the best one. With other methods basing on different cell density higher numbers of cells were obtained, but cell suspensions were markedly contaminated with monocytes.

Literatur: 1 Abell, C. W., C. W. Kamp and L. D. Johnson: *Cancer Res.* 30, 717 (1970). — 2 Bach, M. K. and J. R. Brashler: *Exp. Cell Res.* 63, 227 (1970). — 3 Böyum, A.: *Nature* 204, 793 (1964). — 4 Brandt, L., J. Börjeson, A. Nordén and I. Olsson: *Act. med. scand.* 172, 459 (1962). — 5 Coulson, A. S. and D. G. Chalmers: *Lancet* 1, 468 (1964). — 6 Cooper, H. L. and K. Hirschhorn: *Blood* 20, 101 (1962). — 7 Cooper, H. L. and A. D. Rubin: *Blood* 25, 1014 (1965). — 8 Greenwalt, T. J., M. Gajewski and J. C. McKenna: *Transfusion* 2, 221 (1961). — 9 Hughes, D. and E. A. Caspary: *Int. Arch. Allergy* 37, 506 (1970). — 10 Hulliger, L. and A. A. Blazkovec: *Lancet* 1, 1304 (1967). — 11 Jones, A. L.: *Clin. exp. Immunology* 8, 927 (1971). — 12 Kinoshita, Y., S. Kimura, T. Takeshita, E. Kimura, M. Yukioka and S. Morisawa: *Exp. Cell Res.* 59, 299 (1970). — 13 Kirchner, H. und S. Bauer: *Acta haemat.* 43, 210 (1970). — 14 Kissmeyer, F. and K. E. Kjerby: *Lymphocytotoxic-Micro Techniques*, 15, Nat. Inst. of Health Bethesda, Maryland/USA (1969). — 15 Leder, L. D. und R. Nikolas: *Z. Path.* 73, 228 (1963). — 16 Otto, F. und D. O. Schmid: *Blut* 21, 118 (1970). — 17 Pertoft, H., O. Bäck and K. Lindahl-Kiessling: *Exp. Cell Res.* 50, 355 (1968). — 18 Rabinowitz, Y.: *Blood* 23, 811 (1964). — 19 Rabinowitz, Y.: *Blood* 26, 100 (1965). — 20 Rühl, H., H. Kirchner and G. Bochart: *Proc. Soc. exp. Biol. Med.* 137, 1089 (1971). — 21 Tärnvik, A.: *Acta path. microbiol. scand. Sec. B* 79, 588 (1971). — 22 Tripodi, D., S. Lyons and D. Davies: *Transplantation* 11, 487 (1971). — 23 Turk, A., P. R. Glade and L. N. Chessin: *Blood* 33, 329 (1969). — 24 Vallec, B. L., W. L. Hughes and J. G. Gibson: *Blood* 7, 82 (1947).

Anschr. d. Verff.: H. Scholle, W. Schlag, Dr. H. Rühl, Hämatologische Abteilung, Klinikum Steglitz, D-1 Berlin 45, Hindenburgdamm 30.

Aus dem Klinikum Steglitz der Freien Universität Berlin,
Hämatologische Abteilung (Prof. Dr. H. Brücher)

Lymphozytenstimulation bei Patienten mit chronischer lymphatischer Leukämie: Trennung peripherer Lymphozyten über einen diskontinuierlichen Albumin-Dichtegradienten

Von Wilfried Vogt, Helmut Scholle, Wolfgang Schlag,
Gudrun Bochart und Hartmut Rühl

Zusammenfassung

Periphere Lymphozyten von Patienten mit chronischer lymphatischer Leukämie (CLL) zeigen eine stark reduzierte Stimulation in Gegenwart von Phythämagglutinin. Die Fraktionierung der Lymphozyten über einen diskontinuierlichen Albumin-Dichtegradienten führte zu Subpopulationen, in denen die PHA-reagierenden Lymphozyten angereichert waren.

Summary

Peripheral lymphocytes from patients with chronic lymphocytic leukemia showed a greatly reduced stimulation in response to phytohemagglutinine. Lymphocyte separation by a discontinuous albumin density gradient gave subpopulations in which PHA responsive lymphocytes were enriched.

Patienten mit chronischer lymphatischer Leukämie (CLL) weisen in bezug auf die zelluläre Immunität Defekte auf, die sich unter anderem in einer stark reduzierten Transformationsrate der peripheren Lymphozyten „in vitro“ unter Einwirkung mitogener Substanzen äußern [4,16,23,24,26]. Es gibt aber verschiedene Hinweise dafür, daß neben der vorherrschenden leukotischen Zellpopulation noch normale Lymphozyten vorhanden sind, die sich möglicherweise im gleichen Ausmaß stimulieren lassen wie Lymphozyten von gesunden Spendern [4,9,16,24]. Morphologisch sind die leukotische und die normale Lymphozytenpopulation nicht zu unterscheiden.

Lymphozyten lassen sich mit Hilfe verschiedener Methoden in Subpopulationen auftrennen, die in ihren Funktionen Unterschiede aufweisen [2,3,8,10,14,21,29]. Häufig angewandt wird der Albumindichtegradient, der eine Fraktionierung der Lymphozyten in Klassen unterschiedlicher Dichte bei erhaltener Vitalität zuläßt [1,12,19,21]. Untersuchungen mit Lymphozyten gesunder Versuchspersonen haben gezeigt, daß die Zellen mit geringerer Dichte eine höhere Stimulationsrate aufweisen als die Gesamtpopulation, demgegenüber sind die Subpopulationen größerer Dichte weniger stimulierbar [20].

In der vorliegenden Arbeit sollte untersucht werden, ob durch die Auftrennung der peripheren Lymphozyten von Patienten mit CLL über einen diskontinuierlichen Albumindichtegradienten eine Anreicherung der stimulierbaren Zellen erreicht werden kann.

Material und Methode

Untersucht wurden 8 Patienten mit chronischer lymphatischer Leukämie, die zum Zeitpunkt der Versuche keine zytostatische Therapie erhielten. Als Kontrollgruppe dienten 8 gesunde Versuchspersonen.

A. Isolierung der Lymphozyten aus dem Blut

Wir verwendeten in allen Fällen heparinisiertes Venenblut (10 IE/ml Blut, Liquemin®-Roche). Zur Isolierung der Lymphozyten aus dem Blut der Normalpersonen benutzten wir Glas-säulen (30 × 1 cm) mit Wärmemantel, die mit Nylonfasern (Fenwal Corporation, Morton's Grove, Illinois) unter sterilen Bedingungen gestopft waren. Die Inkubation von etwa 30 Minuten wurde bei 37° C durchgeführt. Nach einer anschließenden 60minütigen Sedimentation bei 37° C unter Zusatz von 6proz. Dextran (Macrodex® Knoll, Molekulargewicht 60000; im Verhältnis 1 : 10) wurde der leukozytenreiche Überstand gewonnen. [Literatur bei 5,11,17,18.] In den so gewonnenen Zellsuspensionen lag der Lymphozytenanteil zwischen 95 und 99%. Beim Patientenblut wurde auf Grund des großen Lymphozytenanteils der weißen Zellen auf eine Säulentrennung mit Nylonfasern verzichtet und nur mit Dextran sedimentiert. Je 1×10^8 Leukozyten wurden auf einen Albumingradienten geschichtet.

B. Herstellung des Albumindichtegradienten

Wir hielten uns bei der Herstellung der Gradienten im wesentlichen an die von Raidt und Mitarb. [19] und Rieber und Mitarb. [20] angegebene Methode. Als Ausgangslösung diente 35proz. steriles Rinderserumalbumin entsprechend einer Dichte von 1,10 g/cm³ (Biotest). Die isotone Lösung hatte einen pH-Wert von 7,1. Mit Hilfe einer Elektrolytverdünnung (Dichte 1,0 g/cm³, Biotest) wurden folgende Albuminlösungen hergestellt: 32% (Dichte 1,091 g/cm³); 29% (Dichte 1,083 g/cm³); 26% (1,074 g/cm³) und 23% (Dichte 1,066 g/cm³). In silikonisierten Zentrifugenröhrchen (12 × 100 mm) wurde der Gradient so aufgebaut, daß auf 2 ml 35proz. Albumin die anderen Lösungen in 2-ml-Portionen geschichtet wurden. Nachdem jeweils 1 ml Zellsuspension aufgetragen war, wurde für 30 min bei 3000 × g zentrifugiert. Anschließend konnten von den einzelnen Grenzschichten mit Pasteurpipetten die Zellen abgehebert werden, die dann zweimal mit Kulturmedium gewaschen wurden. Von jeder Lymphozytenfraktion wurden Ausstriche angefertigt und die absoluten Zellzahlen mit einem elektronischen Partikelzähler (Coulter Counter Modell S) bestimmt. Vitalitätsuntersuchungen wurden mit Hilfe der Trypanblau-Methode durchgeführt [27].

Zur Funktionskontrolle des Gradienten diente eine zweite Passage der Lymphozyten einzelner Dichteklassen durch einen in gleicher Weise hergestellten Albumingradienten.

C. Lymphozytenkulturen

Unsere Methode der Lymphozytenkultur wurde an anderer Stelle ausführlich beschrieben [25]. Jeder Kulturanatz von 3 ml mit Eagle's Minimal Essential Medium enthielt 3×10^6 Lymphozyten und 30proz. autologes Plasma. Die Lymphozyten wurden in Plastikröhrchen (Falcon) 72 h lang im begasten Brutschrank (5% CO₂) bei 37° C kultiviert. Je Versuch wurden Dreifachansätze angelegt und verschiedene Phythämagglutinin-Konzentrationen (PHA P, Difco) getestet. In den letzten vier Stunden erhielt jede Kultur 2 µCi ³H-Thymidin (spez. Aktiv. 2 Ci/mM) und wurde anschließend nach einem Standardverfahren für die Szintillationsmessung aufgearbeitet. Der Stimulationsindex wurde nach folgender Formel errechnet:

$$SI = \frac{\text{mittlere Cpm in PHA-behandelten Kulturen}}{\text{mittlere Cpm in unbehandelten Kontrollkulturen}}$$

Ergebnisse

Die prozentuale Verteilung der Lymphozyten in den einzelnen Dichteklassen unterlag sowohl bei den Kontrollpersonen als auch bei den Patienten großen Schwankungen (Tab. 1). Der größte Anteil der Zellen befand sich im allgemeinen in den Klassen

	Prozentsatz gewonnener Zellen				
	23	26	29	32	35
Normalpersonen	2,1 (1-5)	17,1 (6-31)	50,5 (32-68)	22,8 (6-44)	7,6 (2-14)
Patienten mit CLL	1,7 (1-6)	12,8 (3-31)	41,6 (24-61)	33,4 (5-58)	11,6 (2-31)

Tab. 1: Verteilung der Zellen auf die einzelnen Dichteklassen bei acht Patienten mit chronischer lymphatischer Leukämie und bei acht gesunden Versuchspersonen.

29 und 32. Nur bei zwei Patienten konnten mit den Lymphozyten der Dichteklasse 23 Kulturen angelegt werden, weil die Zellausbeute bei allen anderen Versuchspersonen zu gering war. Morphologisch, aber auch in bezug auf die Vitalität ergaben sich keine wesentlichen Unterschiede zwischen den verschiedenen Lymphozytenklassen. Der Prozentsatz Trypanblau-gefärbter Zellen war bei den Normalpersonen in keinem Versuch größer als 10%, bei den CLL-Patienten wurden allerdings in 2 Fällen (Pat. G. C. und Pat. A. W.) in der Dichteklasse 35 17 bzw. 20% toter Zellen gefunden.

Erwartungsgemäß war die Stimulationsrate in den Lymphozytenkulturen von CLL-Patienten gegenüber dem Normalkollektiv deutlich reduziert. Bei optimalen PHA-Konzentrationen lag der Stimulationsindex (SI) für die gesunden Versuchspersonen zwischen 190 und 19, für das Patientenkollektiv nur zwischen 20 und 3 (Tab. 2 und 4).

Spender	Gesamt- population ¹	Dichteklassen ²				
		23	26	29	32	35
W. L.	140	—	1,0	0,9	0,5	0,4
E. J.	172	—	0,3	0,2	0,2	0,5
A. H.	152	—	0,7	0,5	1,0	—
G. B.	77	—	0,7	1,1	0,8	—
H. R.	190	—	0,7	0,3	0,8	—
W. S.	19	—	1,4	0,9	1,0	0,2
M. P.	51	—	1,3	1,1	0,8	0,9
E. M.	77	—	0,5	0,9	1,1	1,0

¹ Stimulationsindex in der Gesamtzellsuspension.

² Steigerungsrate in den einzelnen Dichteklassen gegenüber dem Stimulationsindex der Gesamtzellpopulation.

Tab. 2: PHA-Stimulation peripherer Lymphozyten bei acht gesunden Versuchspersonen (³H-Thymidineinbau nach 72 h).

Die Fraktionierung der Lymphozyten über einen diskontinuierlichen Dichtegradienten erbrachte bei der Kontrollgruppe keine Zellpopulation, die erheblich besser stimulierbar war als die Gesamtpopulation (Tab. 2). Es wurde zwar in den PHA-Kulturen mit den Zellen der Dichteklassen 26 und 29 ein erhöhter ³H-Thymidin-Einbau gemessen, doch war auch gerade bei diesen Zellen die spontane Thymidininkorporation gegenüber der Gesamtpopulation deutlich erhöht. Aus diesem Grunde war der Stimulationsindex nur etwa gleich dem der Gesamtpopulation.

	Gesamt- population	Dichteklassen				
		23	26	29	32	35
CLL (Pat. G. C.)						
Kontrolle ³	316	—	443	377	441	340
PHA ³	2468	—	8682	1262	1321	480
SI	7	—	19	3	3	1
Normalperson (G. B.)						
Kontrolle ³	940	—	2135	1442	1112	—
PHA ³	72365	—	115290	121073	67832	—
SI	77	—	54	84	61	—

^a Mittlere cpm von Dreifachkulturen.

Tab. 3: PHA-Stimulation peripherer Lymphozyten bei einer gesunden Versuchsperson und einem Patienten mit chronischer lymphatischer Leukämie (³H-Thymidineinbau nach 72 h). Gegenübergestellt sind Kontrollwert in unbehandelten Kulturen, Stimulation in PHA-Kulturen und Stimulationsindex (SI).

Spender	Gesamt- population ⁴	Dichteklassen ⁵				
		23	26	29	32	35
M. J.	5	—	1,6	0,6	0,2	—
A. S.	3	2,3	1,3	1,0	0,3	—
D. M.	17	0,2	1,0	2,5	1,0	—
G. C.	7	—	2,8	0,5	0,3	0,2
W. R.	20	—	2,5	1,1	0,6	0,2
A. W.	15	—	3,1	1,2	0,7	0,2
R. M.	9	—	1,5	1,0	1,1	0,8
J. A.	7	—	2,4	1,1	0,4	—

⁴ Stimulationsindex in der Gesamtzellsuspension.

⁵ Steigerungsrate in den einzelnen Dichteklassen gegenüber dem Stimulationsindex der Gesamtzellpopulation.

Tab. 4: PHA-Stimulation peripherer Lymphozyten bei acht Patienten mit chronischer lymphatischer Leukämie (³H-Thymidineinbau nach 72 h).

Bei allen untersuchten Patienten mit chronischer lymphatischer Leukämie dagegen wurden mit den Lymphozytenpopulationen 26 oder 29 erheblich größere Stimulationsindices erreicht als mit der Gesamtpopulation (Tab. 4). In einem Fall (A. W.) wurde für die Dichteklasse 26 in bezug auf die Ausgangspopulation ein dreimal größerer Stimulationsindex gefunden. Dagegen lagen die Werte für die Klassen größerer Dichte (Dichteklassen 32 und 35) unter denen der Gesamtpopulation. Trotz der verbesserten Stimulationsrate mit den Subpopulationen geringerer Dichte wurden aber nicht gleich hohe Werte für die Thymidininkorporation erreicht wie mit Lymphozyten von gesunden Versuchspersonen (Tab. 3).

Diskussion

Für die verminderte Stimulation peripherer Lymphozyten von Patienten mit chronischer lymphatischer Leukämie unter Einwirkung mitogener Substanzen wird all-

gemein ein zellulärer Defekt verantwortlich gemacht [6,13,23]. Von verschiedenen Seiten konnte gezeigt werden, daß der überwiegende Anteil der peripheren Lymphozyten Charakteristika der sogenannten B-Lymphozyten (bone marrow dependent) aufweist [28]. Dies würde auch die verminderte Stimulierbarkeit erklären, weil für den größten Teil der Stimulantien, darunter Phythämagglutinin, nachgewiesen wurde, daß durch sie nur die T-Lymphozyten (thymus dependent) transformiert wurden [7,22]. Neuere Befunde weisen darauf hin, daß neben der leukotischen Zellpopulation noch eine normal transformierbare Lymphozytenpopulation vorhanden ist [4,9,16,24]. Wir haben von CLL-Patienten mit Hilfe eines diskontinuierlichen Albumingradienten Lymphozytenpopulationen gewinnen können, die deutlich höhere Stimulationsraten aufwiesen als die Gesamtpopulationen. Ähnliche Befunde haben Rieber und Mitarbeiter an Knochenmarksuspensionen von CLL-Patienten erheben können [20]. Dennoch erreicht die DNS-Synthese bei weitem nicht die Größe wie in Lymphozytenkulturen von gesunden Versuchspersonen.

Literatur: 1 Adler, W. H., D. Peavy and R. T. Smith: Cell Immunology 1, 78 (1970). — 2 Amato, D., D. H. Cowan and E. A. McCulloch: Blood 39, 472 (1972). — 3 Bach, M. K. and J. R. Brashler: Exp. Cell Res. 61, 387 (1970). — 4 Bernard, C., A. Gerales and M. Boiron: Lancet 1, 667 (1967). — 5 Brandt, L., J. Börjeson, A. Nördén and I. Olsson: Acta med. scand. 172, 459 (1962). — 6 Brittinger, G., E. König, H. G. Aberle und E. Zimmer-schitt: Schweiz. med. Wschr. 100, 341 (1970). — 7 Davies, A. J. S., H. Festenstein, E. Leuchars, V. J. Wallis and M. J. Doenhoff: Lancet 1, 183 (1968). — 8 Edelman, G. M., U. Rutishauser and C. F. Millette: Proc. Nat. Acad. Sci. 68, 2153 (1971). — 9 Elves, M. W., M. Collinge and M. C. G. Israels: Acta Haemat. 37, 100 (1967). — 10 Hanning, K. und K. Zeiler: Hoppe-Seyler's Z. physiol. Chem. 350, 467 (1969). — 11 Ito, K. and H. Uchino: J. Biol. Chem. 246, 4060 (1971). — 12 Kinoshita, Y., Kimura, S., T. Takeshita, E. Kimura, M. Yukioka and S. Morisawa: Exp. Cell Res. 59, 299 (1970). — 13 Kornfeld, S.: Biochem. Biophys. Acta 192, 542 (1969). — 14 Leif, R. C. and J. Vinograd: Proc. Nat. Acad. Sci. 51, 520 (1964). — 15 Michlmayr, G. und H. Huber: In: Leukozytenkulturen, S. 99, Hrsg. G. Brittinger u. H. J. Roggenbach, F. K. Schattauer Verlag 1971. — 16 Oppenheim, J. J., J. Whang and E. Frei: Blood 26, 121 (1965). — 17 Oppenheim, J. J., B. G. Leventhal and E. M. Hersh: J. Immunol. 101, 262 (1968). — 18 Rabinowitz, Y.: Blood J. Hematol. 23, 811 (1964). — 19 Raidt, D. J., R. I. Mishell and R. W. Dutton: J. exp. Med. 128, 681 (1968). — 20 Rieber, E. P., G. Riethmüller und D. Riethmüller: In: Leukozytenkulturen, S. 87, Hrsg. G. Brittinger u. H. J. Roggenbach, F. K. Schattauer Verlag 1971. — 21 Riethmüller, G., E. P. Rieber und D. Riethmüller: Klin. Wschr. 48, 1343 (1970). — 22 Roitt, I. M., M. F. Greaves, G. Torrigiani, J. Brostoff and J. H. L. Playfair: Lancet 2, 367 (1969). — 23 Rubin, A. D., K. Havemann und W. Dameshek: Blood 33, 313 (1969). — 24 Rühl, H., H. Scholle und H. Kirchner: Acta Haemat. 46, 326 (1971). — 25 Rühl, H., H. Kirchner und G. Bo-chert: Proc. Soc. exp. Biol. Med. 137, 1089 (1971). — 26 Schrek, R. and Y. Rabinowitz: Proc. Soc. exp. Biol. Med. 113, 191 (1963). — 27 Turk, A., P. R. Glade and L. N. Chessin: Blood 33, 329 (1969). — 28 Wilson, J. D. and G. J. V. Nossal: Lancet, 788 (1971). — 29 Zucker, R. M. and B. Chassen: Blood 34, 591 (1969).

Anschr. d. Verf.: Dr. W. Vogt, H. Scholle, W. Schlag, Gudrun Bochert und Dr. H. Rühl. Klinikum Steglitz der Freien Universität Berlin, Hämatologische Abteilung, 1 Berlin 45, Hindenburgdamm 30.

Die Wirkung der L-Asparaginase aus E. coli auf die Makrophagen-Wanderungs-Hemmung und die Lymphocyten-Transformation durch Tuberkulin

W. SCHLAG
HämATOLOGISCHE Abteilung (Prof. Dr. H. Brücher)
Klinikum Steglitz der Freien Universität Berlin

Eingegangen am 6. April 1971

The Effect of L-Asparaginase from E. coli on the Macrophage Migration Inhibition Activity and the Lymphocyte Transformation by Tuberculin.

Summary. Migration inhibition activity could be demonstrated in guinea pig lymph node cultures, even when high concentrations of E. coli L-asparaginase were added together with the specific antigen tuberculin. The production of the migration inhibition factor (MIF) is not inhibited by L-asparaginase, though this enzyme is capable of preventing specific lymphocyte transformation in guinea pig lymph node cultures. Therefore it seems possible, that these two effects of specific antigen on lymphocyte cultures depend on different biochemical mechanisms.

Key-Words: Lymphocytes, Delayed Hypersensitivity, L-Asparaginase, Migration Inhibitionfactor.

Zusammenfassung. Der Überstand von Meerschweinchen-Lymphknotenkulturen hemmt die Wanderung normaler Bauchhöhlenmakrophagen, auch wenn hohe Konzentrationen an L-Asparaginase aus E. coli gemeinsam mit dem spezifischen Antigen Tuberkulin zugesetzt werden. Die Bildung des Migrationshemmfaktors (MHF) wird durch L-Asparaginase nicht gehemmt, obwohl dieses Enzym in der Lage ist, die spezifische Lymphocyten-Transformation in den Kulturen nach 6 Tagen zu verhindern. Möglicherweise beruhen diese beiden Wirkungen eines spezifischen Antigens in Lymphocytenkulturen auf unterschiedlichen Stoffwechselvorgängen.

Schlüsselwörter: Lymphocyten, Allergie vom verzögerten Typ, L-Asparaginase, Migrationshemmfaktor.

Werden Lymphocyten von Versuchstieren, bei denen eine Allergie vom verzögerten Typ induziert wurde, mit dem spezifischen Antigen inkubiert, so kommt es einerseits zur Transformation der Lymphocyten, d.h. zur Induktion von DNS-Synthese und Mitose [8], andererseits wird in den Kulturen der sog. Migrationshemmfaktor (MHF) gebildet, der die Wanderung von Bauchhöhlenmakrophagen in vitro hemmt. Dieses Phänomen ist streng spezifisch für die Allergie vom Spättyp [2, 5]. Das Cytostaticum L-Asparaginase aus *Escherichia coli* (neueste Übersicht bei [4]) hemmt die Transformation menschlicher Lymphocyten durch Phytomitogene und auch durch spezifische Antigene [1, 7]. In den vorliegenden Experimenten sollte der Einfluß dieses Enzyms auf die Transformation und die MHF-Bildung in Lymphocytenkulturen aus Lymphknoten vom Meerschweinchen untersucht werden.

Material und Methode

Allergie vom Spättyp wurde in 300–400 g schweren Albino-Meerschweinchen durch Freund's Volladjuvans (Difco) induziert (0,6 ml intranuchal, 0,1 ml je Fußballen). 3 Wochen später wurden nach Exsanguination aus Axillar- und Inguinal-Lymphknoten in üblicher Weise [5] lymphocytenreiche Zellpopulationen gewonnen. Damit wurden parallel zueinander 1. 24stündige Kulturen (3 ml mit 10^7 Zellen/ml in Petrischalen 35×10 mm, Falcon Plastics) für den Wanderungshemmtest und 2. 6tägige Kulturen (3 ml mit $1,5 \times 10^6$ Zellen/ml in Plastikulturröhrchen 16×125 mm) für die Lymphocyten-

Tabelle. Wirkung von L-Asparaginase aus E. coli auf die Bildung des Migrationshemmfaktors und die Lymphocyten-Transformation in Lymphknotenkulturen des Meerschweinchen

	Makro- phagen- wanderung ^a	DNS- Synthese ^b
Kein Zusatz	100%	1050 cpm
L-Asparaginase 1 IE/ml	102%	980 cpm
Tuberkulin PPD 0,02 mg/ml	29%	11330 cpm
Tuberkulin PPD 0,02 mg/ml + L-Asparaginase 1 IE/ml	32%	950 cpm

^a Wanderung von Peritonealzellpopulationen unbehandelter Tiere im zellfreien Überstand (24 h) der Lymphocytenkulturen sensibilisierter Tiere. Die Wanderung im Überstand der Kultur ohne Zusatz (Planimetrie) ist definitionsgemäß – 100%.

^b ³H-Thymidineinbau nach 6 Tagen Kultur, Mittelwert aus Dreifachansätzen.

transformation mit folgenden Ansätzen angelegt: 1. Nährmedium allein als Kontrollen (TC 199 von Difco, 15% normales Meerschweinchen Serum, 100 IE/ml Penicillin 100 µg/ml Streptomycin); 2. mit L-Asparaginase aus E. coli 1 IE/ml; 3. mit Tuberkulin PPD 0,02 mg/ml (Statens Seruminstitut Copenhagen); 4. mit Tuberkulin PPD 0,02 mg/ml und mit L-Asparaginase 1 IE/ml.

Von den 24stündigen Lymphocytenkulturen wurden die zellreichen Kulturüberstände gewonnen, mit zusätzlichem Tuberkulin (0,02 mg/ml) versetzt, auf Wanderungshemmung mit makrophagenreichen Peritonealzellpopulationen normaler Tiere in bekannter Weise [2] getestet und die Wanderungsflächen planimetrisch ausgewertet. Die 6tägigen Kulturen wurden am Ende der Kulturdauer für 4 Std mit ³H-Thymidin (2 µCi/Kultur) versetzt und anschließend nach einem Standardverfahren für die Szintillationsmessung, wie beschrieben [9], aufgearbeitet.

Ergebnisse

Wie bereits mehrfach gezeigt [2, 5], kann nach 24stündiger Inkubation der Lymphknotenlymphocyten sensibilisierter Tiere mit dem spezifischen Antigen Tuberkulin ein zellreicher Kulturüberstand gewonnen werden, der die Wanderung von Bauchhöhlenmakrophagen unbehandelter Tiere hemmt. Außerdem wurde in Parallelkulturen mit Tuberkulin nach 6 Tagen ein gegenüber den Kontrollen ohne Antigen auf das 10fache gesteigerter Einbau von ³H-Thymidin gemessen als Ausdruck der spezifischen Lymphocyten-Transformation. Diese Transformation kann entsprechend früheren Ergebnissen mit menschlichen peripheren Lymphocyten [6] durch L-Asparaginase aus E. coli vollständig gehemmt werden. Dies erscheint besonders bemerkenswert, da Meerschweinchen Serum selbst L-Asparaginase enthält [4]. Die Bildung des Migrationshemmfaktors wird durch dieses Enzym nicht beeinflusst, selbst dann nicht, wenn 10fache höhere Konzentrationen verwendet werden, als die, die zur Hemmung der Lymphocyten-Transformation ausreichend sind. Dieser Befund läßt unter anderem folgende Erklärungen zu: 1. In den 24stündigen Lymphocytenkulturen wirkt sich der exogene Mangel an L-Asparagin intrazellulär noch nicht aus, die Zellen geraten erst nach längerem Kulturintervall in einen derartigen Mangelzustand. 2. Die Stoffwechselvorgänge, die zur Produktion von MHF führen, werden durch L-Asparaginase nicht beeinflusst, im Gegensatz zu den Prozessen, die in der stimulierten Kultur schließlich zur DNS-Synthese führen. In diesem Fall sind unabhängige Stoffwechselvorgänge für beide Prozesse zu fordern. Neuere Ergebnisse [3] weisen ebenfalls in diese Richtung, wonach bestimmte Kohlenhydratfraktionen des Tuberkulins, die keine Lymphocyten-Transformation verursachen, im Migrationshemmtest wirksam sind.

L-Asparaginase aus E. coli wurde freundlicherweise von den Behring-Werken (Marburg a. d. Lahn) zur Verfügung gestellt.

Literatur

1. Astaldi, G., Burgio, G. R., Krc, J., Genova, R., Astaldi, A. A., Jr.: L-asparaginase and blastogenesis. *Lancet* **1969***I*, 423.
2. Bloom, B. R., Bennett, B.: Mechanism of a reaction in vitro associated with delayed-type hypersensitivity. *Science* **153**, 80 (1966).
3. Chaparas, S. D., Thor, D. E., Godfrey, H. P., Baer, H., Hedrick, S. R.: Tuberculin-active carbohydrate that induces inhibition of macrophage migration but not lymphocyte transformation. *Science* **170**, 637 (1970).
4. Crowther, D.: L-asparaginase and human malignant disease, *Nature (Lond.)* **229**, 168 (1971).
5. David, J. R., Al-Askari, S., Lawrence, H. S., Thomas, L.: Delayed hypersensitivity in vitro: The specificity of inhibition of cell migration by antigen. *J. Immunol.* **93**, 264 (1964).
6. Kirchner, H., Bauer, S.: Wirkung von L-Asparaginase aus *Escherichia coli* auf die Stimulation von Lymphocytenkulturen. *Acta hämat. (Basel)* **43**, 210 (1970).
7. Ohno, R., Hersh, E. M.: The inhibition of lymphocytoblastogenesis by L-asparaginase, *Blood* **35**, 250 (1970).
8. Oppenheim, J. J., Wolstencroft, R. A., Gell, P. G. H.: Delayed hypersensitivity in guinea pig to a protein-hapten conjugate and its relationship to in vitro transformation of lymph node, spleen, thymus and peripheral blood lymphocytes, *Immunology* **12**, 89 (1967).
9. Rühl, H., Kirchner, H., Bocher, G.: Kinetics of the Zn^{2+} -stimulation of human peripheral lymphocytes in vitro. *Proc. Soc. Biol. exp. (N. Y.)*, im Druck 1971.

W. Schlag
Hämatologische Abteilung
Klinikum Steglitz d. FU
D-1000 Berlin 45
Hindenburgdamm 30
Deutschland

Lebenslauf

Ich wurde am 20. Februar 1942 als Sohn des Bankkaufmanns Egon Schlag und seiner Ehefrau Lisbeth Schlag in Berlin geboren. Nach Besuchen der Grundschule und des Gymnasiums legte ich 1962 die Reifeprüfung in Berlin ab.

Mit dem Beginn des Sommersemesters 1962 wurde ich an der Freien Universität Berlin immatrikuliert. Ich studierte im Hauptfach Biologie, mit dem Schwerpunkt Botanik. Die Vorprüfung bestand ich 1964 und die Diplomprüfung am 12. Dezember 1968. Meine experimentelle Diplomarbeit hatte ich unter der Anleitung von Herrn Professor Reinert im Pflanzenphysiologischen Institut der Freien Universität angefertigt.

Seit dem Sommersemester 1968 studierte ich Humanmedizin. Die Vorprüfung des Biologiestudiums wurde mir als Vorphysikum anerkannt. Im Sommer 1969 legte ich die Physikumsprüfung ab. Während des klinischen Studiums bearbeitete ich in der Hämatologischen Abteilung des Klinikums Steglitz experimentelle Fragen, die zum Themenkreis der zellgebundenen Immunität gehörten. Unter anderen führte ich die vorliegende Arbeit durch. Am 15. Februar 1973 bestand ich die ärztliche Staatsprüfung.

